

## Predstavitev Oddelka za eksperimentalno onkologijo

Gregor Serša

Eksperimentalna onkologija se ukvarja s predkliničnimi raziskavami raka. Preučuje mehanizme nastanka in razvoja raka ter učinke različnih vrst zdravljenja ali njihovih kombinacij. Metodološki pristopi eksperimentalne onkologije so različni, lahko so molekularnobiološki, na celični ravni *in vitro* ali na ravni poskusnih živali *in vivo*. Zato potrebujemo molekularnobiološke tehnike, laboratorij za celične kulture in živalsko kolonijo za poskusne živali, pa tudi različne tumorske modele, da preučujemo učinke na celice ali tumorje v živalih. Na takih tumorskih modelih lahko preučujemo odziv celic na zdravljenje v celičnih kulturah, molekularne in biokemične spremembe v njih ter učinke na presajene tumorje v laboratorijskih živalih. Testiramo lahko različne vrste zdravljenja, od citostatikov, bioloških učinkovin, obsevanja z ionizirajočim sevanjem do novih vrst zdravljenja, tako monoterapije kot tudi različne kombinacije. Tako pridobimo znanje o novih načinih ali kombinacijah zdravljenja, kar omogoči njihovo uvajanje v klinično prakso prek tako imenovanih translacijskih raziskav.

Na Onkološkem inštitutu je bilo s preselitvijo v obnovljene prostore v prvem nadstropju stavbe A mogoče na enem mestu združiti vse raziskovalne kapacitete, ki smo jih imeli že pred selitvijo. V novih prostorih imamo vse tehnike, ki so potrebne za eksperimentalno onkologijo, molekularnobiološke in celične kulture ter živalsko kolonijo, združene poleg obsevalne naprave – rentgena za radiobiološke raziskave. S tem so nastali pogoji za ustanovitev **Oddelka za eksperimentalno onkologijo**, kot smo se poimenovali.

**Namen Oddelka za eksperimentalno onkologijo je razvijanje in uvajanje novih pristopov zdravljenja v klinično testiranje in klinično prakso v onkologiji, torej tako imenovane translacijske raziskave.** Oddelek ima dve enoti: *Enoto za radiobiologijo*, katere vodja je prof. dr. Gregor Serša, univ. dipl. biol., in *Enoto za tumorsko bioterapijo*, katere vodja je znanstvena svetnica, doc. dr. Maja Čemažar, univ. dipl. biol. Zasnovan je kot eksperimentalna baza Onkološkega inštituta, kjer se izvajajo raziskave v sodelovanju s sodelavci z našega inštituta in tudi z drugimi raziskovalnimi ustanovami v Sloveniji in po svetu. Trenutno je zaposlenih šest raziskovalcev in en laboratorijski tehnik, od tega sta dva mlada raziskovalca.

Raziskujemo na več raziskovalnih področjih, kar izvajamo v okviru raziskovalnega programa in raziskovalnih projektov Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, pa tudi evropskih projektov in bilateralnega sodelovanja. Področja dela lahko razdelimo v nekaj vsebinskih sklopov, ki se med seboj povezujejo in jih bom na kratko predstavil.

Znanstveno raziskovalno delo oddelka je v zadnjih petnajstih letih vpeto predvsem v **biomedicinske aplikacije**

**elektroporacije.** Elektroporacija je fizikalni pristop, kjer z aplikacijo električnih pulzov na celice ali tumor začasno destabiliziramo celično membrano, s čimer omogočimo, da v celice vstopajo molekule, ki drugače sploh ne bi ali pa bi težko vstopale vanje. Ta metoda je že dolgo znana pri delu s celičnimi kulturami, nekoliko drugačni električni parametri pa omogočajo tudi pristop *in vivo*, in sicer za dostavljanje nekaterih citostatikov, kot sta bleomicin in cisplatin, ali gole DNA-molekule v obliki plazmidne DNA v celice in tkiva. Zdravljenje z uporabo elektroporacije, s katerim povečamo učinek citotoksičnih zdravil, kot sta bleomicin in cisplatin, se imenuje **elektrokemoterapija**, če vnašamo DNA, pa **elektrogenska terapija**.

### Elektrokemoterapija

Na področju elektrokemoterapije smo bili med pionirji tega zdravljenja, ki se je začelo razvijati pred petnajstimi leti. V sodelovanju z Laboratorijem za biokibernetiko Fakultete za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, pod vodstvom prof. dr. Damijana Miklavčiča, in v sodelovanju z dr. Lluisom M Mirom (Institut Gustave Roussy, Francija), smo v tem času to tehniko zdravljenja toliko izpopolnili, da sedaj postaja standardno zdravljenje (slika 1). Preizkusili in uvedli smo nov citostatik, cisplatin, v elektrokemoterapijo, ki je povsem rezultat našega razvoja (1, 2, 3). Zdravljenje z elektrokemoterapijo postaja standardno po uspešnih predkliničnih in kliničnih raziskavah ter ravnokar pripravljeni standardizaciji protokola zdravljenja v okviru evropskega projekta ESOPE, zato se bo lahko izvajalo v vseh kliničnih ustanovah. To ne bi bilo mogoče, če ne bi bil na

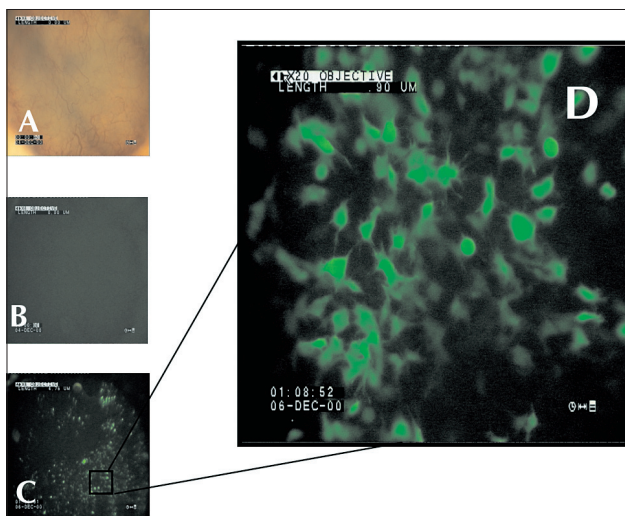


**Slika 1:** Protitumorski učinek elektrokemoterapije s cisplatinom. Kožne tumorske nodule bolnika z malignim melanomom smo zdravili z intratumorskim injiciranjem cisplatina in takoj za tem aplicirali električne pulze na tumor s ploščatimi elektrodami, ki smo jih prislonili na tumor tako, da so objemale posamezne nodule. Viden je dober protitumorski učinek po enkratni terapiji in dober kozmetični učinek, brez brazgotin 10 mesecev po zdravljenju.

voljo tudi generator električnih pulzov CLINIPORATOR™, ki je plod evropskega konzorcija partnerjev, v katerem smo sodelovali tudi mi. Več o mehanizmih delovanja elektrokemoterapije in njenih učinkih bomo poročali v posebnem prispevku te številke Onkologije. Poleg zdravljenja človeških tumorjev uvajamo zdravljenje z elektrokemoterapijo tudi v veterinarsko medicino. Na Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani, v sodelovanju z doc. dr. Natašo Tozon uspešno zdravijo različne primarne tumorje psov, mačk in konjev (4).

### Elektrogensko zdravljenje

Elektrogensko zdravljenje uporablja podoben princip kot elektrokemoterapija. Z uporabo nekoliko drugačnih električnih pulzov dostavljamo v celice DNA brez virusnih vektorjev. Plazmidno DNA lahko vnašamo v normalne celice, kakršne so mišične, in tudi neposredno v tumorske celice *in vitro* ali *in vivo*, z že omenjenim generatorjem električnih pulzov. Razvijamo in optimiziramo parametre, ki so pomembni za uspešno transfekcijo, predvsem v tumorjih, da bi tako dosegli čim večji odstotek transfeciranih celic (5,6). Trenutno preučujemo, kako transfekcija celic z genom *p53* vpliva na različne vrste tumorskih celic glede na to, ali je njihov gen *p53* mutiran ali ne (7). Ob tem nas zanima, ali lahko transfekcija tumorjev z divjim tipom gena *p53* poveča občutljivost celic za cisplatin. Kombinacija tega zdravljenja je zanimiva zato, ker cisplatin inducira apoptotsko smrt celic, če nimajo mutiranega gena, če pa je mutiran, kot je v večini tumorskih celic, se apoptoza ne sproži. Tako pričakujemo, da bo transfekcija celic z mutiranim genom *p53* celice senzibilizirala za citostatsko zdravljenje s cisplatinom, zlasti če ga uporabimo v elektrokemoterapiji (slika 2).



**Slika 2.** Električno posredovana transfekcija v tumorjih. Za vizualizacijo transfekcije smo uporabili golo DNA, ki nosi zapis za zeleno fluorescirajoči protein, ki ga lahko opazujemo s fluorescentnim mikroskopom. Diagram A predstavlja tumor, kakor ga vidimo pod normalno svetlobo, diagram B je tumor pred transfekcijo pod fluorescenčno svetlobo, na diagramih C in D pa zeleno obarvane celice predstavljajo tiste celice, pri katerih je bil električno posredovan vnos DNA uspešen.

Poleg tega, da elektrogensko terapijo testiramo predklinično, jo bomo v okviru evropskega projekta ESOPE testirali tudi v klinični študiji, kjer bomo preverjali uspešnost transfekcije reporterskega gena za  $\beta$ -galaktozidazo pri bolnikih z napredovalim malignim melanomom. Ta študija bo podlaga za nadaljnje delo s terapevtskimi antiangiogenimi geni, prav tako na bolnikih z malignim melanomom, kar bomo preverjali v evropskem projektu ANGIOSKIN.

### Kombiniranje obsevanja tumorjev z novimi pristopi zdravljenja

Obsevalno zdravljenje je eno od standardnih vrst zdravljenja raka, s katerim je zdravljena približno tretjina bolnikov. Dobro poznavanje radiobiologije tumorjev in tudi izpopolnjene tehnike načrtovanja obsevalnega zdravljenja uvrščajo radioterapijo med najbolj dovršene tehnike zdravljenja raka, a vendar se še vedno iščejo načini, kako bi jo izboljšali. Sedaj so zelo aktualni kombinacija obsevanja s spremljajočim lokalnim ali sistemskim zdravljenjem, razvoj novih in izboljšave uveljavljenih tehnik obsevalnega zdravljenja.

Eden od načinov, kako povečati učinkovitost radioterapije, je radiosenzibilizacija tumorjev s kemoterapevtiki, kot sta bleomicin in cisplatin. Ker se ta dva že uspešno uporabljata v kliniki pri zdravljenju različnih tumorjev, smo predvideli, da bi bila kombinacija obsevanja ter elektrokemoterapije z bleomicinom in cisplatinom še uspešnejša. Razlog je v tem, da se koncentracija teh dveh citostatikov v tumorjih po elektroporaciji tumorjev v primerjavi z normalnimi tkivi ob tumorju, ki niso izpostavljeni delovanju električnega polja in je torej vsebnost kemoterapevtikov v njih zanemarljiva, specifično poveča. Naše prve predklinične raziskave kažejo, da se tako poveča radiosenzibilizirajoči učinek bleomicina in cisplatina, specifično na tumorju (8, 9). Ker je izboljšanje odgovora na obsevalno zdravljenje zelo dobro (1,9-krat za bleomicin in 1,7-krat za cisplatin), je lahko taka metoda primerna tudi za klinično uporabo. Pred tem je treba opraviti še dodatne predklinične študije, predvsem preveriti učinkovitost tega kombiniranega zdravljenja pri frakcioniranem obsevanju.

Drug pristop k radiosenzibilizaciji tumorjev je gensko zdravljenje. Na tem področju nameravamo preučevati učinke elektrogenskega zdravljenja z različnimi geni, kot so *p53* gen in antiangiogeni geni v kombinaciji z radioterapijo.

### Meritve pretoka krvi in oksigenacije v tumorjih za napoved in spremljanje uspešnosti zdravljenja

Stopnja prekrvavitve in oksigeniranosti tumorja je pomemben fiziološki dejavnik, ki v veliki meri vpliva na biološki potek rasti tumorja in tudi na uspešnost zdravljenja tumorjev. Znano je, da je stopnja oksigeniranosti tumorjev dober napovedni dejavnik tako za izid obsevalnega zdravljenja kot tudi kemoterapije. Poleg tega je sledenje prekrvavljenosti tumorja dober pokazatelj uspešnosti zdravljenja. Med terapevtskimi pristopi, ki so usmerjeni na tumorsko žilje, so pristopi za preprečevanje rasti tumorskih žil, tako imenovano antiangiogeno zdravljenje, terapije, pri katerih ciljamo obstoječe žilje, tarča njihovega delovanja pa

so endotelne celice tumorskih žil, pa antivaskularno oziroma žilnorazdiralno zdravljenje.

Eden od učinkov aplikacije električnih pulzov na tumor je modulacija pretoka krvi v tumorjih, takojšnje zmanjšanje pretoka krvi za 70–80 % in oksigenacije tumorjev s počasno povrnitvijo na predhodno stanje po 24 urah (10). Ta učinek lahko izkoristimo z nekaterimi vrstami zdravljenja, ki so protitumorsko učinkovitejše v suboptimalnih fizioloških razmerah; taka so bioreduktivna zdravila (tirapazamin) in hipertermija. Naše prve raziskave teh kombinacij kažejo, da je elektroporacija uspešna kot selektivni pristop spreminjanja fizioloških razmer v tumorju za okrepitev protitumorskega učinka tirapazamina in hipertermije (11, 12).

Preučevali smo tudi učinek elektrokemoterapije z bleomicinom in cisplatinom na prekrvavitev in oksigenacijo tumorjev. Ob tem smo ugotovili, da elektrokemoterapija na tumorsko žilje učinkuje tudi antivaskularno (13,14,15). Ta mehanizem doprinese k celokupnemu protitumorskemu učinku elektrokemoterapije. S tem so odprte tudi nekatere nove biomedicinske aplikacije elektrokemoterapije, na primer antivaskularno zdravljenje tumorjev.

V prihodnje bomo nadaljevali meritve in raziskave modulacije pretoka krvi in oksigenacije tumorjev zaradi različnih terapij in načrtovali antangiogeno in antivaskularno zdravljenje.

### Sodelovanje pri drugih projektih

Poleg teh temeljnih torišč raziskovalne dejavnosti Oddelka za eksperimentalno onkologijo sodelujemo tudi pri drugih raziskovalnih projektih. Tako v okviru programske skupine sodelujemo s prof. dr. A. Cörom z Medicinske fakultete v Ljubljani. Njegov doprinos k raziskovalnemu programu so raziskave COX-2, encima ciklooksigenaze-2, ki katalizira sintezo prostaglandinov iz arahidonske kisline. COX-2 je izražen predvsem v tumorskih celicah in celicah ob vnetju, zato predstavlja specifično tarčo za tumorske celice, proti kateri so že znana različna zdravila. Določanje COX-2 v različnih tumorjih in njegova napovedna vrednost pri zdravljenju različnih tumorjev je glavni cilj tega dela raziskovalnega programa (16).

Nekateri citostatiki poleg citotoksičnega delovanja tudi zmanjšajo pretok in oksigenacijo tumorjev. V sodelovanju pri projektu prof. dr. M. Auersperg preučujemo, kakšen je vpliv majhnih odmerkov vinblastina v dolgih infuzijah kot monoterapije in v kombinaciji z drugimi citostatiki, kot je npr. adriamicin, na pretok krvi v tumorjih in na mehanizme njihovega delovanja (17). Te vrste raziskav bodo imele pomemben klinični pomen, saj nekatere tumorje v onkologiji zdravijo prav s takimi terapevtskimi odmerki, način in mehanizem njihovega delovanja pa še ni povsem razjasnjen.

Pomembno je tudi sodelovanje med skupinami iz Francije in Slovenije, kjer v okviru projekta PICS raziskujemo nove teoretične modele celične in tkivne permeabilizacije, njihovo validacijo na poskusnih modelih, pa tudi tehnološke aplikacije. Francoska partnerja sta skupini dr. Lluisa M. Mira iz Pariza in dr. Justina Teissieja iz Toulousea, v Sloveniji pa sodelujeta skupina prof. dr. Damijana Miklavčiča s Fakultete za elektrotehniko, Univerza v

Ljubljani, in naša raziskovalna skupina z Onkološkega inštituta.

Meritve oksigenacije v tumorjih so za naše raziskave pomembne in jih izvajamo v sodelovanju z dr. Marjeto Šentjunc s centra EPR na Institutu Jožef Stefan. Vsebnosti platine za določanje količine vnosa cisplatina v tumorje določamo v sodelovanju s skupino dr. Radmile Milačič in dr. Janeza Ščančarja z Odseka za kemijo okolja, Institut Jožef Stefan. Testiranje novih analogov platinskih kompleksov poteka v sodelovanju s prof. dr. Natašo Bukovec in doc. dr. Sabino Grabner s Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani. Razvoj celičnih linij z gensko modifikacijo za biomonitoring genotoksičnih snovi pa raziskujemo s prof. dr. Tamaro Lah-Turnšek in doc. dr. Metko Filipič z Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani.

### Pedagoško delo

Delavci Oddelka za eksperimentalno onkologijo se vključujemo tudi v pedagoške procese na dodiplomskem in podiplomskem študiju. Na dodiplomskem študiju smo aktivni na Visoki šoli za zdravstvo, Univerza v Ljubljani, in na Šoli za znanosti o okolju, Politehnika Nova Gorica, na podiplomskem študiju pa pri študiju biomedicine in biotehnike.

### Viri

1. Serša G, Štabuc B, Čemažar M, Miklavčič D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: Clinical experience in malignant melanoma patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 863–7.
2. Serša G, Čemažar M, Rudolf Z. Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients (review article) *Cancer Therapy* 2003; 1: 133–42.
3. Čemažar M, Wilsom I, Dachs GU, Tozer G, Serša G. Direct visualization of electroporation-assisted in vivo gene delivery to tumors using intravital microscopy – spatial and time dependent distribution. *BMC Cancer* 2004; 4: 81.
4. Snoj M, Rudolf Z, Čemažar M, Jančar B, Serša G. Successful sphincter-saving treatment of anorectal malignant melanoma with electrochemotherapy, local excision and adjuvant brachytherapy. *Anti-Cancer Drugs* 2005; 16: 345–8.
5. Tozon N, Kodre V, Serša G, Čemažar M. Effective treatment of perianal tumors in dogs with electrochemotherapy. *Anticancer Res* 2005; 25: 839–46.
6. Čemažar M, Golzio M, Rols MP, Serša G, Teissie J. Electrically-assisted nucleic acid delivery in vivo: Where do we stand? *Current Pharmaceutical Design* accepted.
7. Čemažar M, Grošel A, Glavač D, Kotnik V, Skoberne M, Kranjc S, Mir LM, Andre F, Opolon P, Serša G. Effects of electrogenetherapy with p53wt combined with cisplatin on survival of human tumor cell lines with different p53 status. *DNA Cell Biol* 2003; 22: 765–75.
8. Serša G, Kranjc S, Čemažar M. Improvement of combined modality therapy with cisplatin and radiation using electroporation of tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 1037–41.
9. Kranjc S, Čemažar M, Grošel A, Ščančar J, Serša G. Electroporation of LPB sarcoma cells in vitro and tumors in vivo increases radiosensitizing effect of cisplatin. *Anticancer Res* 2003; 23: 275–82.

10. Serša G, Čemažar M, Parkins CS, Chaplin DJ. Tumour blood flow changes induced by application of electric pulses. *Eur J Cancer* 1999; 35: 672–7.
11. Čemažar M, Parkins CS, Holder A, Kranjc S, Chaplin DJ, Serša G. Cytotoxicity of bioreductive drug tirapazamine is increased by application of electric pulses in SA-1 tumours in mice. *Anticancer Res* 2001; 21: 1151–56.
12. Karner KB, Lesničar H, Čemažar M, Serša G. Antitumour effectiveness of hyperthermia is potentiated by local application of electric pulses to LPB tumours in mice. *Anticancer Res* 2004; 24: 2343–8.
13. Serša G, Čemažar M, Miklavčič D, Chaplin DJ. Tumor blood flow modifying effect of electrochemotherapy with bleomycin. *Anticancer Res* 1999; 19: 4017–22.
14. Serša G, Kržič M, Šentjerc M, Ivanuša T, Beravs K, Kotnik V, Coer A, Swartz HM, and Čemažar M. Reduced blood flow and oxygenation in SA-1 tumours after electrochemotherapy with cisplatin. *Brit J Cancer*, 2002; 87: 1047–54.
15. Čemažar M, Parkins CS, Holder AL, Chaplin DJ, Tozer GM, Serša G. Electroporation of human microvascular endothelial cells: evidence for an anti-vascular mechanism of electrochemotherapy. *Brit J Cancer* 2001; 84: 565–70.
16. Legan Mateja. The role of cyclooxygenase-2 in the malignant tissue and possible applicability of cyclooxygenase-2 inhibitors in the therapy of cancer. *Radiol Oncol* 2003; 37: 187–94.
17. Serša G, Kržič M, Šentjerc M, Ivanuša T, Beravs K, Čemazar M, Auersperg M, Swartz HM. Reduced tumor oxygenation by treatment with vinblastine. *Cancer Res* 2001; 61: 4266–4271.